

假单胞菌 YZ-26 来源环酰亚胺水解酶中半胱氨酸残基的反应性及功能

钮利喜, 刘晓琴, 石亚伟*

山西大学生物技术研究所, 教育部化学生物学与分子工程重点实验室, 太原 030006

摘要:【目的】研究环酰亚胺水解酶(Imidase, CIH)中的两个半胱氨酸残基的反应性及功能。【方法】设计了3个半胱氨酸突变酶:CIH_{7,108}、CIH₇、CIH₁₀₈。将天然酶以及突变酶基因分别与麦芽糖结合蛋白(MBP)基因在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中进行融合表达,融合蛋白经纯化后得到了电泳纯的样品。使用5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)对天然酶CIH的巯基基团进行修饰,并分析了DTT对分子状态的影响。进一步研究了经H₂O₂处理后CIH及其突变酶的锌离子结合能力及分子状态。【结果】酶活测定表明CIH_{7,108}和CIH₇的活力基本丧失,而CIH₁₀₈仍保持了72%的酶活性。CIH中的两个半胱氨酸残基以游离形式存在,不形成链内或链间二硫键。CIH与CIH₁₀₈为四聚体结构且具有一定的锌离子结合能力,CIH_{7,108}为多聚体,CIH₇为单体及多体的混合物且都不具备锌离子结合能力,随着H₂O₂浓度的增加,CIH中的链内二硫键及CIH₁₀₈中的链间二硫键逐渐增加。【结论】说明Cys7是结合锌离子和稳定CIH分子结构的必要残基。

关键词: 环酰亚胺水解酶, 半胱氨酸, 反应性, 功能

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)06-0776-07

环酰亚胺水解酶(cyclic imide hydrolase, EC. 3. 5. 2. 16)是环酰胺酶(包括海因酶、二氢尿嘧啶酶、二氢乳清酸酶、尿囊素酶等)中的一个亚类,也称酰亚胺酶(Imidase, CIH)^[1]。20世纪40年代,首次报道了动植物中的亚胺类水解酶,其广泛分布在各种生物有机体中。20世纪50年代,科学家从小牛肝脏中分离出以二氢尿嘧啶为底物的亚胺水解酶,并命名为二氢尿嘧啶酶^[2]。但是,二氢尿嘧啶酶大部分作用于哺乳动物中亚胺类物质的水解,而在微生物中水解亚胺类物质的涉及到两个酶,一个是D-海因酶,另一个是CIH。这3种酶虽都可以催化亚胺类物质的水解,但是却具有

不同的底物谱:哺乳动物来源的二氢尿嘧啶酶的底物范围较广,可以催化D-海因酶的全部底物及部分CIH底物,CIH可以催化简单的环酰亚胺类物质及含硫类环酰亚胺,但是对单替代环酰脲和杂环环酰胺不具有催化活性^[3]。CIH可以催化底物打开环酰胺键,生成相应的半酰胺,最终进入类似于TCA的代谢途径^[4]。在生物体内,CIH的生理作用可能是催化异生物质的降解^[5],并能够催化环状碳酸酯的水解^[6]。Ogawa J等^[4]在1997年研究芽生杆菌(*Blasterbacter sp.*) A17-4中首先发现和分离纯化了CIH并对该酶的理化性质进行了研究,但未见相关核酸和蛋白序列的报道。2002

基金项目:山西省回国留学人员科研资助项目(201007)

* 通信作者。Tel: +86-351-7018268; E-mail: yaweishi@sxu.edu.cn

作者简介:钮利喜(1978-),男,山西阳高人,讲师,硕士生导师,主要从事蛋白质与酶工程研究。E-mail: nlx@sxu.edu.cn

收稿日期:2010-12-02;修回日期:2011-02-27

年,王宇等报道了从真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*) 112R₄ 中克隆到 CIH 基因,其核酸序列和氨基酸序列已提交 GenBank 登录(Accession No.: AF373287),这是对微生物中 CIH 的核酸和蛋白序列的首次报道^[7]。本室从假单胞杆菌(*Pseudomonas putida*) YZ-26 中克隆到一个新的 CIH 基因(Accession No.: DQ093858),并将其克隆到表达载体中进行表达纯化,对其各种理化性质都进行了研究^[8]。

半胱氨酸的巯基反应基团是一类重要的活性基团,不仅常常作为酶活性位点的残基参与酶催化反应,也可通过二硫键的形成参与蛋白分子结构的调节,从而在蛋白的三级结构的保持中发挥重要作用。半胱氨酸的巯基的性质类似于丝氨酸中的羟基,属于极性基团常参与锌离子的结合^[9]。CIH 中含有两个半胱氨酸残基,全部突变后酶的活性几乎全部丧失^[10],为了鉴别两个半胱氨酸的巯基(-SH)基团对 CIH 的活性及结构的影响,我们将 CIH 的两个半胱氨酸残基分别或者全部突变为甘氨酸,测定天然酶和突变酶的活性和分子状态;分析是否形成链内或链间的二硫键,结合化学修饰对天然酶和突变酶性质进行了比较。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:宿主菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、*E. coli* BL21 (DE3),质粒 pMAL-s、pE-*cih*₂₉₃ 均为本室保存。质粒 pMAL-s 由 pMAL-p2X (购于美国 NEB 公司)改造所得(将 Factor Xa 识别序列改为 PreScission Protease 识别序列)。

1.1.2 主要试剂和仪器:Taq DNA Polymerase、T₄ DNA ligase、PrimeSTAR[®] HS Polymerase、限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、DNA Marker、Protein Marker 均为大连宝生物工程有限公司产品;琼脂糖为美国 FMC 公司产品;Amylose 亲和柱、Sephacryl S-200 凝胶柱、ÄKTA purifier 10 购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司;恒温摇床型号为 ZHWY-100D,购自上海智城分析仪器制造有限公司;PCR 扩增仪型号为 PTC-200,购自 MJ Research 公司;离心机型号为 5417R,购自 Eppendorf 公司。其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 重组环酰亚胺水解酶及突变体 CIH_{7,108}、CIH₇、CIH₁₀₈ 的构建

1.2.1 引物:根据 CIH 基因序列与预期希望获得的突变酶 CIH_{7,108} (将 7,108 位的半胱氨酸突变为甘氨酸)、CIH₇ (将 7 位的半胱氨酸突变为甘氨酸)、CIH₁₀₈ (将 108 位的半胱氨酸突变为甘氨酸)分别设计了含酶切位点 *EcoR* I 的上游引物(FW)和 *Hind* III 的下游引物(RV)以及中间引物(如表 1 所示),由大连宝生物公司合成并纯化。

表 1 文中所用引物

| Table 1 Primers used in the paper | | |
|-----------------------------------|---|-----------------|
| Name | Sequence (5'→3') | Use |
| FW | <i>CGGAATTC</i> ATGGCCAAGGAAATC | <i>cih</i> ORF |
| RV | CCG <i>AAGCTT</i> TCACTTCTTGGCGGG | amplification |
| FW7 | GCGAATTCATGGCCAAGGAAATC CTC <i>GCCAG</i> | C7G mutation |
| FW108 | GTGCTCGACAAG <i>GGC</i> ATCGACCTC | C108G |
| RV108 | GAGGTCGAT <i>GCCCTT</i> GTCTGAGGAC | mutation |

^{*} Restriction sites and mutation sites in the primers are printed in italics and underlined.

1.2.2 PCR 扩增:以 pE-*cih*₂₉₃ 为模板,使用引物 FW/RV 和 FW7/RV 扩增 *cih* 和突变酶 *cih*₇,扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。突变酶 *cih*₁₀₈ 和 *cih*_{7,108} 先利用高保真酶 PrimeSTAR[®] HS Polymerase 进行含点突变位点的基因片段 PCR,使用引物分别为 (FW108, RV108, FW, RV) 和 (FW7, FW108, RV108, RV),扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 变性 10 s;55 $^{\circ}$ C 退火 5 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。然后再以获得的含突变位点的两个基因片段为模板,利用搭桥法进行全长基因的 PCR。

1.2.3 重组子构建:PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,检测扩增片段大小,对目的片段采用胶回收试剂盒进行纯化,然后 *EcoR* I/*Hind* III 37 $^{\circ}$ C 酶切 4 h,再与经相同酶切的载体 pMAL-s,16 $^{\circ}$ C 过夜连接,分别构建重组质粒 pMAL-s-*cih*、pMAL-s-*cih*_{7,108}、pMAL-s-*cih*₇、pMAL-s-*cih*₁₀₈,次日将连接产物转化入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,利用菌体 PCR 筛选阳性克隆,DNA 测序确认,所有操作均按分子生物学手册进行^[11]。

1.3 环酰亚胺水解酶突变体的表达及纯化

将重组质粒 pMAL-s-*cih*、pMAL-s-*cih*_{7,108}、pMAL-s-*cih*₇、pMAL-s-*cih*₁₀₈ 分别转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞,在 LB 平板上挑取单菌落接种

到含100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡过夜培养, 次日按 2 % 接种量转接到新鲜的 LB 培养基中, 当 OD_{600} 为 0.6 - 0.8 时, 加 IPTG 至终浓度为 0.25 mmol/L, 继续诱导培养 5 h, 离心收集菌体 (3000 \times g, 10 min), 用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 洗菌体两次, 再重悬于 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中, 冰上超声破碎, 18000 \times g, 离心 30 min, 取混悬液, 上清, 沉淀进行 SDS-PAGE 检测, 分析表达产物的可溶性。重组酶的纯化和 MBP 融合标签的去除与之前的 CIH 纯化相同^[12]。

1.4 环酰亚胺水解酶活性测定

酶活力测定的标准反应体系为 1.5 mL, 向含底物海因 100 mmol/L 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中加入适量酶液或菌体。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡反应 30 min, 立即加入 250 μL 10 % 三氯乙酸 (TCA), 250 μL 10 % 对二甲氨基苯甲醛和 1 mL 蒸馏水。混匀后, 8000 \times g 离心 10 min, 取上清, 在 430 nm 测定吸光值^[13]。

酶活力定义: 在上述条件下, 1 min 内生成 1 μmol 产物或消耗 1 μmol 底物所需酶量称为一个酶活单位 (U)。比活力为 1 mg 蛋白质所示的酶活力 (U/mg)^[14]。

1.5 环酰亚胺水解酶中巯基含量分析

环酰亚胺水解酶巯基的含量分析采用 Ellman 法^[15]。配制溶液 86 mmol/L Tris, 90 mmol/L glycine, 4 mmol/L EDTA, 10 mol/L 的尿素, pH 8.0。将 200 μL 纯酶溶液加入 800 μL 上述溶液中 (蛋白浓度: $C = 0.2 \text{ mg}/\text{mL}$), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 4 h, 然后再加入上述溶液 2 mL, 4 mg/mL DTNB 50 μL , 5 min 后, 测定 $A_{412\text{nm}}$, 空白对照为 3 mL 含 50 μL DTNB 上述溶液。根据如下公式计算游离巯基的数量^[16]:

$$\mu\text{mol}/\text{L SH}/\text{g} = 73.35 \times A_{412} \times D/C$$

$A_{412\text{nm}}$ 是 412 nm 处的光吸收值, D 是稀释倍数 ($D = 3$), C 是蛋白浓度 (mg/mL)。

1.6 DTT 对环酰亚胺水解酶分子状态影响

取等量的酶液, 分别加入还原性的上样缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl (pH = 6.8), 0.1% 溴酚蓝, 100 mmol/L DTT, 10% 甘油, 2% SDS) 与非还原性的上样缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl (pH = 6.8), 0.1% 溴酚蓝, 10% 甘油, 2% SDS)^[14], 然后进行 SDS-PAGE 分析。

1.7 环酰亚胺水解酶及其突变体 CIH_{7,108}, CIH₇ 和 CIH₁₀₈ 与 PAR 的锌离子竞争实验

向 CIH, CIH_{7,108}, CIH₇ 和 CIH₁₀₈ 的纯酶溶液中加入终浓度为 6 mmol/L 的二十二碳五烯酸 (DPA), 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 d, 然后经 1 L 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液 (MilliQ 级纯水配制) 透析 6 h \times 3 次, 得到相应的脱辅酶。将上述脱辅酶分别滴加到含有 60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 4-(2-吡啶偶氮)-间苯二酚 (PAR), 4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ZnCl₂ 的 20 mmol/L Hepes (pH = 7.5) 反应体系中。以未加入纯酶液的 500 nm 处的吸收值为 100%, 计算不断加入突变体后的相对吸收值。

1.8 H₂O₂ 对环酰亚胺水解酶及其突变体的影响

在适量的 CIH、CIH₇、CIH₁₀₈ 酶液中加入 H₂O₂ 至终浓度分别为 1 mmol/L 和 5 mmol/L, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h, 加入非还原性的上样缓冲液, 沸水煮沸 5 min, 进行 SDS-PAGE 分析。

1.9 环酰亚胺水解酶及其突变体的分子状态分析

酶分子寡聚体的分析在 ÄKTA purifier 进行。2 mg 纯酶分别上样于预先用 20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl (pH = 8.0) 平衡的 Superose-12 柱进行分子排阻分析, 流速为 0.5 mL/min, 记录各样品的保留体积。

2 结果

2.1 环酰亚胺水解酶及其突变体的纯化及酶活测定

重组质粒 pMAL-s-cih_{7,108}、pMAL-s-cih₇、pMAL-s-cih₁₀₈ 经过 EcoR I / Hind III 双酶切鉴定及 DNA 测序验证, 均表明已经构建成功且序列正确无误。将上述重组子转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 经终浓度为 0.25 mmol/L 的 IPTG 诱导及 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养表达 3 - 5 h 后, 离心收集菌体。将菌体超声破碎后的上清与沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 显示上清中均存在一条相对分子量约 78 kDa 的蛋白带, 与计算分子量 76.4 kDa 基本相符。上清经 Amylose 亲和层析, ProScission Protease 切割去除 MBP-tag, 硫酸铵沉淀及疏水层析后都可得到电泳纯的蛋白 (如图 1 所示)。活性测定结果显示: CIH_{7,108} 与 CIH₇ 基本没有活性, 而 CIH₁₀₈ 保留了 72% 的酶活, 可见 Cys7 是维持 CIH 酶活性的必要残基。

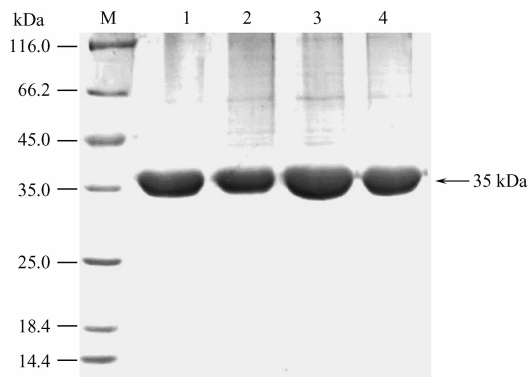


图 1 重组环酰亚胺水解酶及其突变体的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the purified CIH and its mutants. M: standard molecular weight; Lane 1: Wild type CIH; Lane 2: CIH₇, Cys7 was mutated to glycine; Lane 3: CIH_{7,108}, both Cys7 and Cys108 in CIH were mutated to glycine; Lane 4: CIH₁₀₈, Cys108 was mutated to glycine.

2.2 环酰亚胺水解酶中游离巯基数分析

在测定巯基时,人们常常把蛋白质中游离的巯基(未形成二硫键的巯基)分为两部分:一部分是埋藏在蛋白分子内的巯基,一部分是暴露在蛋白表面的巯基。一般采用加变性剂如 SDS、尿素的缓冲溶液溶解蛋白质是测定游离巯基总量,而不含变性剂所能测定只是蛋白表面的巯基^[15]。从 CIH 蛋白质一级结构序列分析可知其只有两个半胱氨酸残基,但我们不知是以何种状态存在于蛋白中。我们测定了其加与不加 10 mol/L 尿素变性剂两种条件下的游离巯基数,结果表明,虽然样品处理条件不同,但是-SH 含量分别为 52.94 μmol/g 与 47.89 μmol/g,平均值为 50.42,与样品中理论值 57.14 μmol/g 相接近,CIH 中的两个半胱氨酸残基大部分是以游离状态存在,且存在于蛋白表面,没有形成链内二硫键,也没有形成链间二硫键。

2.3 DTT 对环酰亚胺水解酶分子状态影响

DTT 是一种小分子有机还原剂,常常用于蛋白质中二硫键的还原,因而阻止蛋白质中的半胱氨酸之间所形成分子内或分子间二硫键。经凝胶电泳分析,加 50 mmol/L DTT 与不加 DTT 的样品均在 SDS-PAGE 胶上在 35.0 kDa 处有一条带(图 2),进一步说明 CIH 中的两个半胱氨酸残基是以游离状态存在,不存在链内二硫键及链间二硫键。

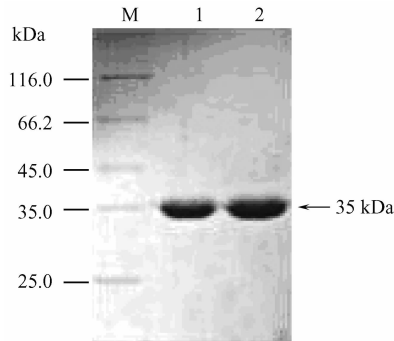


图 2 环酰亚胺水解酶中二硫键的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the disulfide bond of the imidase. M: standard molecular weight; Lane 1: imidase treated with DTT; Lane 2: imidase treated without DTT.

2.4 环酰亚胺水解酶及其突变体 CIH_{7,108}, CIH₇ 和 CIH₁₀₈ 与 PAR 的锌离子竞争实验

Ogawa 等首次报道 *Blasterbacter* sp. A17-4 CIH 为金属依赖酶^[4],我们在随后对来自假单胞杆菌 YZ-26 的 CIH 进行分析,该酶可以被 1 mmol/L 的 Ni²⁺, Co²⁺ 等激活,但被 Cu²⁺, Zn²⁺ 等抑制^[12],进一步的分析揭示该酶属于含锌的金属酶^[10]。在 pH = 7.5 的条件下,PAR 与 zinc 按 2:1 的比例形成 Zn(PAR)₂ 复合物,结合常数为 3.2 × 10¹¹ (mol/L)⁻¹^[17]。随着 apo-CIH 不断加入 60 μmol/L PAR, 4 μmol/L ZnCl₂, 20 mmol/L HEPES (pH 7.5) 的反应体系中,复合物 Zn(PAR)₂ 会逐渐减少而 zinc/

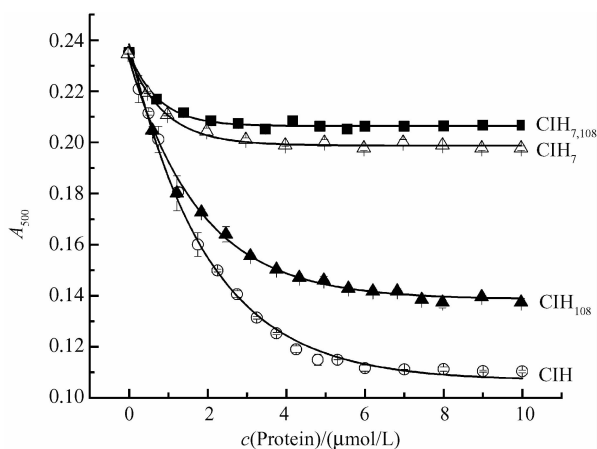


图 3 环酰亚胺水解酶及其突变体与 PAR 竞争结合 Zn(II)

Fig. 3 Competition of zinc between mutated CIH and PAR. Absorption at 500 nm of the (PAR)₂Zn complex upon addition of increasing amount CIH, CIH₇, CIH₁₀₈ and CIH_{7,108}. Conditions: 60 μmol/L PAR, 4 μmol/L ZnCl₂, 20 mmol/L HEPES, pH 7.5.

CIH 会相应逐渐增多,因此,500 nm 处的 $Zn(PAR)_2$ 的特异吸收值也会相应降低。结果如图 3 所示, CIH_7 与 $CIH_{7,108}$ 与 PAR 的竞争锌离子的能力相当,而 CIH_{108} 却明显还保留较高的锌离子竞争能力与野生型的 CIH 相当,可以推测第 7 位的 Cys 是影响 CIH 结合锌离子的必要残基。

2.5 H_2O_2 对环酰亚胺水解酶及其突变体的影响

H_2O_2 是一种强氧化剂,可以使蛋白分子表面的半胱氨酸残基氧化形成二硫键。通过其氧化实验可以分析半胱氨酸残基的存在状态。当 CIH, CIH_7 及 CIH_{108} 处于 H_2O_2 氧化环境中,4℃ 处理 1 h 后,非还原 SDS-PAGE 分析,如图 4 所示:CIH 经 H_2O_2 处理后,此酶的两个半胱氨酸形成链内二硫键,且随着 H_2O_2 浓度的升高,链内二硫键逐渐增多,但始终形不成分子间的二硫键;当突变了 108 位的半胱氨酸后,此酶的单体只剩下 7 位一个半胱氨酸残基,它不形成链间二硫键,保持酶分子的稳定状态;当突变了 7 位的半胱氨酸后,此酶的单体中只有 108 位的一个半胱氨酸残基,酶分子的分子状态发生改变,随着 H_2O_2 浓度的增高,链间二硫键逐渐增多,成为多聚体状态。可以说明 108 号位相比 7 号位的半胱氨酸残基可能位于更接近分子表面,易于被氧化,同时也是影响蛋白分子状态的位点。在天然分子中各个亚基间的 108 位半胱氨酸残基位于比较近的位置。但要比单个亚基内的 7 号与 108 号残基的距离大,所以在野生型蛋白中优先形成分子间的二硫键。

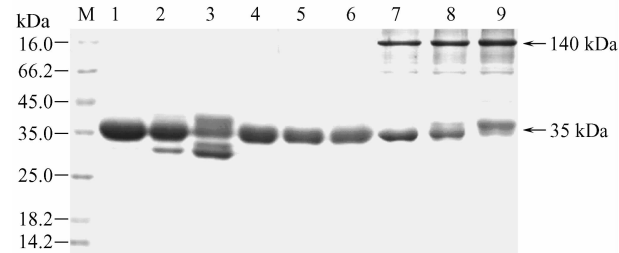


图 4 H_2O_2 处理后的环酰亚胺水解酶及其突变体的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of CIH and its mutants treated with H_2O_2 . M: standard molecular weight; Lane 1: CIH; Lane 2: CIH treated with 1 mmol/L H_2O_2 ; Lane 3: CIH treated with 5 mmol/L H_2O_2 ; Lane 4: CIH_{108} ; Lane 5: CIH_{108} treated with 1 mmol/L H_2O_2 ; Lane 6: CIH_{108} treated with 5 mmol/L H_2O_2 ; Lane 7: CIH_7 ; Lane 8: CIH_7 treated with 1 mmol/L H_2O_2 ; Lane 9: CIH_7 treated with 5 mmol/L H_2O_2 .

2.6 环酰亚胺水解酶及其突变体的分子状态分析

SDS-PAGE 电泳分析显示,CIH 亚基分子量大约为 35 kDa,如图 5 所示,野生型的 CIH 在 Superose 12 (16/30) 分子排阻层析中的洗脱体积为 12.3 mL,根据标准的蛋白标准曲线,我们可以算出其天然蛋白分子量约为 140 kDa,因此其为四聚体^[8]。而 $CIH_{7,108}$ 在 Superose 12 (16/30) 分子排阻层析中的洗脱体积为 8.5 mL,约为 602 kDa 的 16 聚体,为多聚体,这说明两个半胱氨酸残基是维持 CIH 四聚体状态必须的,一旦突变掉,酶就会聚合成没有活性的多聚体状态。当只突变掉 108 位的半胱氨酸残基时,酶的四聚体状态并没有改变,同时也保留了约 72% 的酶活。但是若突变了 7 位的半胱氨酸残基时, CIH_7 在 Superose 12 (16/30) 分子排阻层析中出现了两个洗脱峰,一个在 8.5 mL,一个在 15.2 mL,说明 CIH_7 蛋白中既有单体存在,又有多聚体存在,但没有显示酶活性的四聚体 (12.3 mL 洗脱峰),这样很好解释为何 CIH_7 为何没有酶的活性。这些结果充分说明:CIH 中 7 位的半胱氨酸残基是维持 CIH 四聚体状态的必需残基,也是酶活性发挥的关键因素。

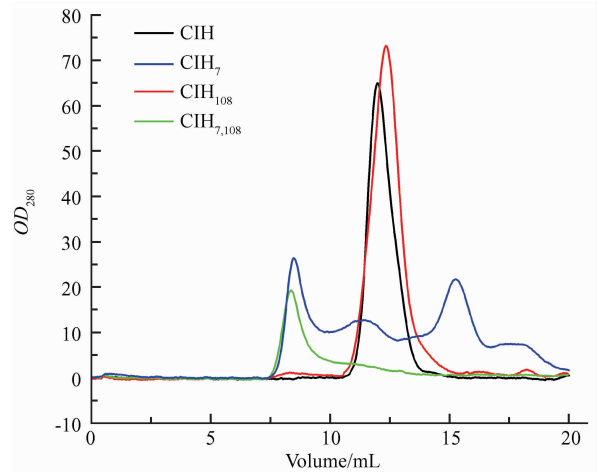


图 5 环酰亚胺水解酶及其突变体的分子排阻层析

Fig. 5 CIH and its mutants analyzed by Size-exclusion chromatography using Superose 12 column.

3 讨论

与二氢尿嘧啶酶不同的是,CIH 不水解 5'-单替代海因^[4],它参与细菌体内的环酰亚胺代谢,催化环酰亚胺开环为半酰胺,最后进入三羧酸循环中^[18]。由于细菌及哺乳动物中的 CIH 可以用于有

机酸生产,如非天然的氨基酸,丙酮酸以及 3-氨基甲酰- α -吡啶酸的生产,这些有机酸都是半合成抗生素,杀虫剂及食品添加剂的重要组成成分,因而 CIH 受到了人们的广泛关注^[19,20]。半胱氨酸残基中的硫原子是一种亲核及亲电子的原子,可以形成多种的巯基相关衍生物(如硫醚,硫酯和硫代缩醛),有实验表明:牛的视紫红质蛋白中的 110 位及 187 位的半胱氨酸残基是此蛋白发挥正常功能的重要残基。因此,半胱氨酸残基是各种生物偶联反应的常见残基^[21]。本实验以不同半胱氨酸残基突变体的酶活差异为基础,利用 Ellman 法分析了 CIH 中仅有的两个半胱氨酸残基的存在状态,并结合锌离子的竞争实验,氧化还原及分子筛层析等方法分析了该酶中的两个半胱氨酸残基对 CIH 的重要性。研究表明,CIH 中的两个半胱氨酸残基在天然状态下,以游离形式存在,不形成链内及链间二硫键,且两个残基位于酶的表面,所以直接参与锌离子的结合的几率很小,但是 Cys7 会影响酶与锌离子的结合。在氧化环境下,会有部分酶中的两个半胱氨酸残基形成链内二硫键,当 7 位的半胱氨酸残基突变后,酶以单体及聚体两种形式存在,且氧化的程度越强,酶聚合的越多。而 108 位的半胱氨酸残基突变后,酶分子状态没有改变,结构较稳定,不随着氧化程度的加强而聚合。最后,如果两个半胱氨酸残基双突变后,酶会全部聚合。综上所述,在天然状态下,CIH 中的两个半胱氨酸残基不形成链内及链间二硫键,且功能也各不相同:Cys7 是维持 CIH 分子稳定结构的必要残基,CIH₇ 已不能保持酶的活性状态四聚体,进而与锌离子的结合也明显降低,但是 Cys108 不影响酶分子状态,CIH₁₀₈ 有一定的锌离子结合能力,酶活性仍保留 72%。

参考文献

- [1] Soong CL, Ogawa J, Shimizu S. A novel amidase (half-amidase) for half-amide hydrolysis involved in the bacterial metabolism of cyclic imides. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5): 1947-1952.
- [2] Huang CY, Yang YS. The role of metal on imide hydrolysis: metal content and pH profiles of metal ion-replaced mammalian imidase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2002, 297(4): 1027-1032.
- [3] Soong CL, Ogawa J, Shimizu S. Cyclic ureide and imide metabolism in microorganisms producing a D-hydantoinase useful for D-amino acid production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, 12(1-6): 61-70.
- [4] Ogawa J, Soong CL, Honda M, Shimizu S. Imidase, a dihydropyrimidinase-like enzyme involved in the metabolism of cyclic imides. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 243(1-2): 322-327.
- [5] Yang YS, Ramaswamy S, Jakoby WB. Rat liver imidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(15): 10870-10875.
- [6] Yang YL, Ramaswamy S, Jakoby WB. Enzymatic hydrolysis of organic cyclic carbonates. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(14): 7814-7817.
- [7] 王宇, 张英姿, 丁久元, 刘阳剑, 王绛, 余志华. 真养产碱杆菌 112R4 酰亚胺酶基因的克隆、序列分析及其在大肠杆菌中的表达. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2002, 42(20): 153-156.
- [8] 崔丽方. 环酰亚胺水解酶的基因克隆、融合表达和生化性质. 山西大学生物技术研究所硕士学位论文, 2006.
- [9] Karnik SS, Sakmar TP, Chen HB, Khorana HG. Cysteine residues 110 and 187 are essential for the formation of correct structure in bovine rhodopsin. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 1988, 85(22): 8459-8463.
- [10] Shi YW, Liu XQ, Shi P, Zhang XY. Characterization of zinc-binding properties of a novel imidase from *Pseudomonas putida* YZ-26. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 2010, 494(1): 1-6.
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [12] 史鹏, 张学尧, 王丽丽, 石亚伟. 环酰亚胺水解酶在大肠杆菌中的重组表达与纯化. *山西大学学报(自然科学版) (Journal of Shanxi University (Natural Science Edition))*, 2008, 31(2): 252-257.
- [13] Niu LX, Zhang XY, Shi YW, Yuan JM. Subunit dissociation and stability alteration of D-hydantoinase deleted at the terminal amino acid residue. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(2): 303-308.
- [14] 陈云霞, 钮利喜, 袁静明, 石亚伟. 突变型环酰亚胺水解酶的底物专一性研究. *中国生物工程杂志 (China Biotechnology)*, 2007, 27(6): 46-50.
- [15] Ellman GD. Tissue sulfhydryl groups. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 1959, 82(1): 70.

- [16] Beveridge T, Toma SJ, Nakai S. Determination of SH and S-S group in some food proteins using Ellman's reagent. *Journal of Food Science*, 1974, 39(1): 49-57.
- [17] Bergman T, Zhang K, Palmberg C, Jörnvall H, Auld DS. Zinc binding to peptide analogs of the structural Zinc site in alcohol dehydrogenase: implications for an entatic state. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65(24): 4019-4027.
- [18] Ogawa J, Soong CL, Honda M, Shimizu S. Novel Metabolic Transformation Pathway for Cyclic Imides in *Blastobacter* sp. Strain A17p-4. *Applied Environmental Microbiology*, 1996, 62(10): 3814-3817.
- [19] Ogawa J, Soong C L, Ito M, Shimizu S. Enzymatic production of pyruvate from fumarate—an application of microbial cyclic-imide-transforming pathway. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, 11(4-6): 355-359.
- [20] Soong CL, Ogawa J, Honda M, Shimizu S. Cyclic-imide-hydrolyzing activity of D-hydantoinase from *Blastobacter* sp. strain A17p-4. *Applied Environmental Microbiology*, 1999, 65(4): 1459-1462.
- [21] Stitham J, Gleim SR, Douville K, Arehart E, Hwa J. Versatility and differential roles of cysteine residues in human prostacyclin receptor structure and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(46): 37227-37236.

Reactivity and function of cysteine residues in imidase from *Pseudomonas putida* YZ-26

Lixi Niu, Xiaoqin Liu, Yawei Shi*

Institute of Biotechnology, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: [**Objective**] We investigated the reactivity and function of two cysteine residues in imidase (CIH) by site-directed mutagenesis. [**Methods**] Three variants of imidase (CIH) were constructed with Cys7 and Cys108 or only one of them substituted with Gly. The two thiol groups of Cys7 and Cys108 of imidase were specifically modified separately or collectively by dithio-bis-nitrobenzoic acid (DTNB) in the native state. It was also confirmed by SDS-PAGE analysis. To further verify the above results, the oligomeric structure and sulfhydryl groups of native and mutant CIH were also examined by measuring zinc binding ability and molecular size under different concentrations of H_2O_2 . [**Results**] Compared with CIH, CIH₁₀₈ retained 72% activity, while CIH_{7,108} and CIH₇ had no activity using DL-hydantoin as substrate. The spectral detection result shown that the two thiol groups were both in a free state. It is indicated that CIH and CIH₁₀₈ are tetramer, CIH_{7,108} is multimer, and CIH₇ is a mixture of monomer and multimer. The zinc binding ability of CIH₁₀₈ was still relative high, while CIH₇ and CIH_{7,108} decreased obviously. The increased concentration of H_2O_2 could increase the intrachain disulfide bond of CIH and the interchain disulfide bond of CIH₁₀₈. [**Conclusion**] All data imply that the Cys7 is required for binding zinc ion and maintaining the stable structure of enzymatic molecule.

Keywords: imidase, cysteine, reactivity, function

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Research Project from the Shanxi Scholarship Council of China (201007)

* Corresponding author. Tel: +86-351-7018268; E-mail: yaweishi@sxu.edu.cn

Received: 2 December 2010/ Revised: 27 February 2011